

細胞外低カリウムにより出現するHERGチャネルの使用頻度依存性変化に関する研究

著者	深堀 耕平
号	2230
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/10097/22812

氏 名（本籍）	ふか 深	ほり 堀	こう 耕	へい 平
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 2 2 3 0 号			
学位授与年月日	平 成 17 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻			
学 位 論 文 題 目	細胞外低カリウムにより出現する HERG チャネルの使用頻度依存性変化に関する研究			

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 白 土 邦 男	教授 八 尾 寛
	教授 上 月 正 博	

論文内容要旨

背景

HERG 遺伝子は遅延整流カリウム (K^+) 電流の rapid component (I_{Kr}) をコードする。HERG 遺伝子により発現するこの K^+ チャネルは、心筋再分極を促進する重要な外向き電流を制御している。したがって、HERG チャネルが阻害されると心筋再分極は遅延し、後天性 QT 延長症候群を生じることとなる。さまざまな薬物が HERG チャネルを阻害し、低 K^+ 血症や徐脈は薬物による阻害作用を増強する。しかしながら、低 K^+ 血症や徐脈そのものが HERG チャネルにもたらす変化は、必ずしも明らかではない。HERG チャネルには、細胞外 K^+ イオン (K^+_o) を増やすと、細胞内外 K^+ イオンの電気化学ポテンシャルに反し外向き電流を増加させる、という逆説的な特徴がある。この機序は当初 K^+_o がチャネルの不活性化を抑制するためと理解されていた。しかし、その後、HERG チャネルが細胞外ナトリウムイオン (Na^+) により抑制され、 K^+_o がその作用に拮抗するという新たな結果が提示された。HERG チャネルのこれら陽イオンによる制御は、低 K^+_o 状態での HERG 電流に複雑な変化をもたらすが、その詳細な機序は不明である。

研究目的

静止状態においた HERG チャネルに脱分極パルスを繰り返し与えると、正常な K^+_o 濃度の細胞外液では HERG 電流の大きさは常に一定である。しかし、低 K^+_o 状態とすると、脱分極パルスを繰り返すたびに、HERG 電流は次第に増大するという現象が認められる（使用頻度依存性電流増加）。本研究では、この使用頻度依存性現象の出現する細胞外陽イオン条件、および低 K^+_o 状態における刺激頻度と定常電流の関係を明らかにし、後天性 QT 延長症候群における低 K^+ 血症と徐脈の役割を検討した。

方法

CHO-K1 細胞に HERG チャネルを発現させ、ホールセルパッチクランプ法を用いて全膜電流を測定した。① 使用頻度依存性現象を明らかにするため、細胞外陽イオン環境を変化させ（細胞外 1 価陽イオンの総和は 146 mM と一定）、 -80 mV の静止状態においた細胞に、0.1 Hz で脱分極パルスを繰り返し、初期電流と定常電流を比較した。② 使用頻度依存性現象が認められたイオン環境で、刺激頻度が定常電流に及ぼす影響を検討した。

結 果

① 正常 K^+ 液では使用頻度依存性変化は認められず、初期電流と定常電流は同じであった。 $[K^+]_o \leq 2 \text{ mM}$ で使用頻度依存性の電流増加現象が出現し、 K^+ を除去した上で Na^+ を低下させるとこの現象はより顕著になった。しかし、 Na^+ も除去するとこの現象は消失し、また Na^+ を Li^+ に置換しても認められなくなった。これらの結果より、 $[K^+]_o \leq 2 \text{ mM}$ と Na^+ の存在の 2 条件が、使用頻度依存性の電流変化出現に必要と考えられた。② 上記の実験で最大の変化を認めた細胞外陽イオン環境 (K^+ -free/20 mM $[Na^+]_o$) にて、刺激頻度の定常電流に及ぼす影響を検討した。0.008 Hz 刺激による定常電流は 0.1 Hz 刺激の 32.4% と著明に減少した。また、生理的なイオン環境 (2 mM $[K^+]_o$ /144 mM $[Na^+]_o$) においても、低頻度刺激 (0.017 Hz) の定常電流は高頻度刺激 (0.2 Hz) の 88.4% と有意に小さかった。いずれも刺激頻度を変えると、定常電流の大きさは可逆的に変化した。

考 察

本研究では、低 K^+ あるいは低 Na^+ とすると、脱分極パルスにより誘発される HERG 電流は初期と定常状態で著しく異なることが初めて明らかになった。また、HERG チャンネルは全く同一のイオン環境であるにも関わらず、刺激頻度により電流の大きさが異なるというユニークな特性を有することも判明した。HERG チャンネルの kinetics は最もシンプルなモデルでは、Closed \leftrightarrow Open \leftrightarrow Inactivated, の 3 つの state で説明される。今回の結果をこのモデルにあてはめると、 Na^+ が HERG チャンネルポアに closed state で結合し、脱分極でチャンネルポアから解離するというモデル (Closed- Na^+ \leftrightarrow Closed-free \leftrightarrow Open \leftrightarrow Inactivated) が想定される。脱分極パルスにより Na^+ の結合と解離が繰り返され、Closed-free state のチャンネルが徐々に増加して定常状態に達すると考えられた。また K^+ のチャンネルポアに対する親和性は、 Na^+ の 30~50 倍程度と他の電位依存性 K^+ チャンネルに比較して低いため、ある範囲の低 K^+ イオン条件においては HERG チャンネル outer pore において Na^+ イオンと K^+ イオンが競合し、これが使用頻度依存性電流変化の発生機序となっている可能性もある。

審 査 結 果 の 要 旨

HERG チャンネルは、遅延整流カリウム電流 (I_K) の rapid component (I_{Kr}) を形成する K イオンチャンネルである。このチャンネルを流れる電流は心筋再分極を制御する重要な外向き電流であり、チャンネルを構成するアミノ酸の変異により先天性 QT 延長症候群 (LQT2) を引き起こす。また、HERG チャンネルの outer pore は、他の一般的な電位依存性 K チャンネルにはない特異なアミノ酸配列を有し、さらに outer pore 内腔の容積が大きいので、薬物による影響を非常に受けやすい。抗不整脈薬に限らず、抗生物質、抗ヒスタミン薬、消化管作動薬などの多様な薬物がこのチャンネルを阻害し、後天性 QT 延長症候群の原因となることが明らかにされている。また、低 K 血症や徐脈は、薬物による HERG チャンネルの阻害作用をさらに増強する。HERG チャンネルの阻害により、torsades de pointes 型の心室頻拍や突然死が誘発されることから、このチャンネルの制御機構を解明することは、致死性不整脈防止の観点から極めて重要である。これまでの研究より、HERG チャンネルは細胞外 K^+ を除去すると、細胞外 Na^+ により強力に阻害されることが明らかにされている。この阻害作用は細胞外 K^+ により拮抗されるが、微量の細胞外 K^+ 存在下で細胞外 Na^+ が HERG チャンネルに及ぼす効果は不明であった。本研究ではこれら細胞外陽イオンを変化させることにより、HERG チャンネルに極めてユニークな特性が存在することが初めて明らかになった (以下)。

1) $[K^+] \leq 2 \text{ mM}$ とすると、トレイン刺激により誘発される HERG 電流は、初期 (I_{ist}) と 5 分後定常電流 (I_{ss}) で著しく異なり、チャンネルの使用依存性に電流が増大する。この現象は正常 K^+ 液中では認められず、低 K^+ かつ Na^+ の存在が必要である。

2) 全く同一のイオン環境であるにも関わらず、 $[K^+] \leq 2 \text{ mM}$ では刺激頻度の違いにより I_{ss} が異なる。同様の現象は他の電位依存性チャンネルでは報告されていない。

上記 1), 2) の現象が起こるメカニズムとして、他の電位依存性 K チャンネルに比較して、 K^+ の HERG チャンネルに対する親和性が低く、 Na^+ イオンの影響を受けやすいこと、および Na^+ による HERG チャンネルの closed state block という現象が考えられる。

今回の実験系で得られた結果は、生体内での事象に単純に適合はできないが、徐脈時の QT 延長に新たなメカニズムの存在する可能性を提示している。 $[K^+] \leq 2 \text{ mM}$ は臨床的に十分経験する濃度であり、低 K 血症と徐脈の合併には充分留意する必要がある。

以上、本論文は綿密な実験計画に基づいた研究であり、低 K 血症の状態では HERG 電流が抑制される分子機構を電気生理学的に解析し、outer pore における K^+ と Na^+ の分子相互作用とその意義を証明した極めて興味深い論文である。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。